

遺伝子検出システム、これを備えた遺伝子検出装置、検出方法、並びに遺伝子検出用チップ

5

技術分野

本発明は、遺伝子検出システム、これを備えた遺伝子検出装置、検出方法、並びに遺伝子検出用チップに関し、特に、ハイブリダイゼーションによる遺伝子検出を高感度かつ高速に行うための遺伝子検出システム等に関する。

10

背景技術

遺伝子の検出は、ターゲットである目的遺伝子とプローブとをハイブリダイゼーションさせ、各種のシグナルを検出して行われる。このハイブリダイゼーションは、遺伝子の相補的な塩基配列同士が特異的に結合する（ハイブリダイズする）性質を利用し、目的遺伝子の配列を検出する方法であり、サザンハイブリダイゼーションやDNAマイクロアレイ等に応用されている技術である。

このハイブリダイゼーションによる二本鎖形成状態は、環境温度に依存する。二本鎖形成DNAは温度によって結合力が変化し、ある特定の温度（T_x）より高い温度では解離し、一本鎖状態へと移行する。この特定の温度はプローブを構成する4種の塩基含有率、塩基数などのプローブ条件と、溶液の塩濃度などの環境条件によってきまり、プローブ毎の固有値が与えられることとなる。この温度T_xにおいてはプローブと完全な相補的配列を有する遺伝子のみがプローブと二本鎖を形成する。

一方、ターゲット遺伝子の配列にプローブと相補的でない塩基数が増えるに従って、このT_xは低下する。これより、ハイブリダイゼーション法で微小な塩基配列の変異を検出するためには、温度をコントロールして測定を行うことが重要である。

従来の遺伝子検出装置においては、外側が断熱材で被覆された容器の中に、目

的遺伝子が溶解した溶液を注入した後、当該溶液を T_x より所定温度低く保った状態でハイブリダイゼーションさせ、その後、ペルチェ素子等を用いてこの溶液を加熱し溶液の温度を T_x に保った状態で検出するか、あるいは温度が T_x である洗浄液によって二本鎖を洗浄した後に検出していた。

5 しかし、従来の遺伝子検出装置においては、容器の中に注入された溶液全体を加熱又は冷却する必要があったため、加熱又は冷却する溶液の量が多く、目的とする温度へ到達する時間が長くなり、検出に時間がかかるという問題がある。

また、従来の遺伝子検出装置は、容器の中に注入された溶液のみを加熱あるいは冷却するものであるため、溶液とは接していないプローブ固定担体の部分の表面から放熱ないし吸熱現象が生ずることにより、プローブ固定担体の溶液と接している部分の表面の温度を適切にコントロールできないという問題がある。特に、
10 プローブ固定担体が熱伝導率の高い素材からなる場合には、温度をコントロールすることが困難となる。

また、S N P (Single nucleotide polymorphism) 等の検出では、二本鎖形成状態の至適温度 T_x を正確に設定する必要があるが、従来の遺伝子検出装置のよう¹⁵に溶液全体を加熱ないし冷却するものでは、微妙に温度を調整することが困難であるという問題がある。

さらに、従来の遺伝子検出装置は、溶液の温度を制御しているため、一回の検出では一種類の温度しか設定できない。プローブ固定担体側に異なる遺伝子配列²⁰を有する複数のプローブを固定した場合には、それぞれのプローブに対して固有の T_x は異なるので、一回の検出で複数の温度を設定することは不可能である。したがって、複数のプローブを固定した場合には、 T_x をその都度変えて検出をしなければならないために検出に一層時間がかかるという問題がある。

25 発明の開示

本発明は、上記従来の問題点を解決することを目的とするものであり、高感度かつ高速大量（ハイスループット）に遺伝子を検出でき、信頼性のある解析が可能な遺伝子検出システム、遺伝子検出装置、検出方法、並びに遺伝子検出用チッ

プを提供する。

本発明は、上記課題を解決するために、目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせて検出する遺伝子検出システムであって、プローブが固定されるプローブ固定担体と、前記プローブ固定担体のプローブを固定する面とは異なる他の箇所に接触して配置された加熱冷却手段と、を備えたことを特徴とする遺伝子検出システムを提供する。

プローブ固定担体のプローブを固定する面とは異なる他の箇所に接触し、とは、加熱冷却手段がプローブ固定担体のプローブ固定面と反対の面に接触して配置されていてもよいし、プローブ固定担体の側面に接触して配置されていてもよい、
との意味である。

プローブとは、目的遺伝子を探索する探索子の意味である。プローブとしては、目的遺伝子と相補的な塩基対部分を有するヌクレオチド鎖が用いられ、具体的には、同一の又は異なる遺伝子配列を有する複数のP C R 産物、オリゴヌクレオチド、m R N A 、c D N A 、P N A (peptidic nucleic acid) 、又はL N A (locked nucleic acid ; Proligo LLC 社商標) 等が用いられる。

本発明では、加熱冷却手段によりプローブ固定担体を加熱及び冷却のうち少なくともいずれかを行って、溶液中に浸漬されたプローブ固定担体の表面近傍の溶液のみの温度をコントロールするので、温度コントロールする容積が微量でありT_xへ到達する時間も大幅に短縮され、高感度かつ高速に検出を行なうことができる。

なお、二本鎖形成状態の至適温度T_xは、融解温度 (T_m) であってもよい。また、T_xは融解温度 (T_m) よりも低温の所定温度であってもよい。

また、本発明は、前記加熱冷却手段は、前記プローブ固定担体のプローブを固定する面とは反対の面に接触して配置された均熱部材と、さらに均熱部材に接触して配置された加熱冷却素子と、を備えてなる遺伝子検出システムを提供する。

加熱冷却手段は、加熱のみを行なう手段であっても、冷却のみを行なう手段であっても、加熱及び冷却を行なう手段であっても、いずれでもよい。したがって、加熱冷却素子は、温度調整素子として機能するものであれば特に限定されず、加

熱素子であっても、冷却素子であっても、加熱及び冷却を行なう素子であっても、
いずれでもよい。

均熱部材は、プローブ固定担体の温度を均一に制御するために、プローブ固定
担体と加熱冷却手段との間に介設される。この均熱部材は、加熱冷却手段が加熱
5 行なう際には集熱板として作用し、加熱冷却手段が冷却を行なう際には放熱板
として作用する。

また、本発明は、前記均熱部材の熱容量は、前記プローブ固定担体の熱容量よ
り大きいことを特徴とする遺伝子検出システムを提供する。

均熱部材ないしプローブ固定担体の熱容量は、それぞれを構成する素材の比熱
10 およびその質量から求められる。均熱部材の熱容量が、プローブ固定担体の熱容
量より大きいことにより、加熱冷却手段からプローブ固定担体へ熱流束が必要以
上に流れることを防止することができ、プローブ固定担体の温度が均一に保たれ
る。また、プローブ固定担体の温度が急激に上昇する結果生じるオーバーシュー
トを防ぎ、ゆっくりとした温度コントロールをすることも可能となる。特に、プロ
15 ブーブ固定担体が複数ある場合において、プローブ固定担体の温度抵抗がばらつ
いても、プローブ固定担体の温度を均一に保つことができる。

また、本発明は、前記均熱部材は、当該均熱部材の温度を計測する温度センサ
ーを備えており、当該温度センサーにより計測した温度に基づいて前記加熱冷却
素子の駆動を制御することを特徴とする遺伝子検出システムを提供する。

20 温度センサーによる計測温度に基づいて加熱冷却素子を駆動させ、目標温度
(T_x) となるように制御すれば、正確かつ迅速にプローブ固定部位近傍の溶液
のみを T_x とすることができる。また、所定の目標温度設定手段により、目標温
度を設定して、計測温度と目標温度との差をなくすように加熱冷却素子を自動的
に駆動させフィードバック制御すれば、より正確かつ迅速にプローブ固定部位近
25 傍溶液の温度を制御することができる。なお、プローブ固定担体の表面部又は全
部が熱伝導性の高い素材から構成されている場合には、均熱部材、プローブ固定
担体、及びプローブ固定部位近傍溶液のすべてを同一の温度であると近似するこ
とができる。

前記加熱冷却素子は、ペルチェ素子又はヒーターであってもよい。

また、本発明は、前記プローブ固定担体の一部又は全部が目的遺伝子を含む溶液に浸漬した状態において、前記加熱冷却手段と目的遺伝子を含む溶液との間で、プローブ固定担体を介して熱流束が伝達するように構成したことを特徴とする遺伝子検出システムを提供する。

本発明では、プローブ固定担体の一部又は全部が目的遺伝子を含む溶液に浸漬した状態において、加熱冷却手段とプローブ固定担体との間、並びにプローブ固定担体と目的遺伝子を含む溶液との間で熱流束が伝達するので、溶液中に浸漬されたプローブ固定担体の表面近傍の溶液のみを温度コントロールすることができる。ここで、熱流束とは正の熱流束と負の熱流束との両方を意味する。すなわち、加熱冷却手段が加熱を行なう場合には、正の熱流束が加熱冷却手段からプローブ固定担体へ伝達し、さらにプローブ固定担体から溶液へと伝達する。一方、加熱冷却手段が冷却を行なう場合には、負の熱流束が加熱冷却手段からプローブ固定担体へ伝達し（熱がプローブ固定担体から加熱冷却手段へ伝達し）、さらに負の熱流束がプローブ固定担体から溶液へ伝達する（熱が溶液からプローブ固定担体へ伝達する）。熱流束が溶液中へ伝達している際には、プローブ固定担体の表面近傍に薄い温度境界層が形成される。この温度境界層では急激な温度分布が形成され、プローブ固定担体の表面近傍のみがプローブ固定担体の温度とほぼ同一温度となる。本発明では、ハイブリダイゼーションにおいて溶液全体を温度コントロールする必要がなく、プローブ固定部位近傍の溶液のみを温度コントロールすれば足り、温度コントロールする容積が微量であるため、 T_x へ到達する時間も大幅に短縮され、高感度かつ高速に検出を行なうことができる。

前記プローブ固定担体は、熱伝導率が $30\text{ W/m}\cdot\text{K}$ 以上の素材からなることが好ましい。熱伝導率が $30\text{ W/m}\cdot\text{K}$ 以上であると、熱流束が加熱冷却手段と溶液との間でプローブ固定担体を介して適切に伝達し、プローブ固定部位近傍が好適に温度コントロールされる。プローブ固定担体の熱伝導率が $300\text{ W/m}\cdot\text{K}$ 以上であると、さらに好ましく熱流束が伝達されプローブ固定部位近傍がより好適に温度コントロールされる。

また、本発明は、前記プローブ固定担体は、プローブが固定される電極と、当該電極を支持する電極基盤と、からなる遺伝子検出システムを提供する。

本発明においても、電極の一部又は全部が目的遺伝子を含む溶液に浸漬した状態において、熱流束が、加熱冷却手段から電極基盤へ、電極基盤から電極へ、電極表面から目的遺伝子を含む溶液へと流れ、溶液中に浸漬された電極の表面近傍の溶液のみを温度コントロールすることができるので、高感度かつ高速に遺伝子を検出することができる。

また、本発明では、電極に固定したプローブを電気化学的に検出することにより、より高感度に遺伝子を検出することができる。

前記電極は、周面が断熱材で被覆されてなり、前記加熱冷却手段からの熱流束が電極基盤を介して電極端面から目的遺伝子を含む溶液に流れるように構成してもよい。電極の周面からは熱が放熱ないし吸熱しないようにしながら、電極の端面近傍の溶液のみを温度コントロールすることにより、より高感度かつ高速に検出することができる。

電極は、ピン状であることが好ましい。また、電極は1つであっても、複数の電極がマトリックス状ないしアレイ状に配列されていても、いずれでもよい。電極を被覆する断熱材としては、P E E K (ポリエーテルエーテルケトン) 又はP T F E (ポリテトラフルオロエチレン) が好ましい。

前記電極は少なくともその表面に熱伝導率が30W/m・K以上の素材からなる部分を備え、前記電極基盤は熱伝導率が30W/m・K以上の素材からなることが好ましい。電極の少なくとも表面に所定素材からなる部分を備え、とは、電極の表面が所定素材でコーティングされていてもよいし、電極自身が所定素材で構成されていてもよい意味である。電極の表面の一部のみが所定素材でコーティングされていてもよいが、この場合は、電極基盤から流れてきた熱流束が、電極表面のコーティング部分を介して目的遺伝子を含む溶液へ流れるように構成する必要がある。電極基盤の熱伝導率が30W/m・K以上であると、熱流束が加熱冷却手段から電極基盤、電極を介して溶液へ適切に伝達し、プローブ固定部位近傍が好適に温度コントロールされる。電極および電極基盤の熱伝導率が300W

$\text{m} \cdot \text{K}$ 以上であると、さらに好ましく熱流束が伝達されプローブ固定部位近傍がより好適に温度コントロールされる。

前記電極は少なくともその表面に金、銀又は銅からなる部分を備え、前記電極基盤はセラミックスからなることが好ましい。

5 上記においては、前記電極は複数の電極からなっていてもよい。

また、本発明は、前記電極は複数の電極からなり、それぞれに複数の種類のプローブが固定されていてもよく、前記電極基盤は当該複数の電極をそれぞれ支持する複数の電極基盤からなり、前記加熱冷却手段は、前記複数の電極基盤の温度をそれぞれ独立して制御することを特徴とする遺伝子検出システムを提供する。

10 本発明のように電極基盤および電極を複数設け、それぞれの電極に複数の種類のプローブを固定し、電極基盤の温度を独立して制御することにより、一回の検出で複数の T_x をそれぞれ独立に設定することができる。それぞれ異なる T_x を持つプローブのハイブリッド状態を各至適温度で一斉に検出することができる。

15 本発明は、上記の遺伝子検出システムと、前記加熱冷却手段を駆動制御する制御手段と、を備えた遺伝子の検出装置を提供する。

本発明は、上記遺伝子検出システムを用いた遺伝子の検出方法であって、前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体を所望の温度に調節し、目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせて形成された二本鎖を電気化学的に検出することを特徴とする遺伝子の検出方法を提供する。

20 本方法では、加熱冷却手段によりプローブ固定担体の表面近傍の溶液のみの温度をコントロールするので、高感度かつ高速に検出を行なうことができる。

本発明は、上記遺伝子検出システムを用いた遺伝子の検出方法であって、目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせて二本鎖を形成させる過程と、前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体の温度を変化させながら電極反応の応答を計測し、当該温度と電極反応の応答との関係から、前記二本鎖を検出する過程と、を有することを特徴とする遺伝子の検出方法を提供する。プローブ固定担体の温度を変化させながらとは、上昇させながらでも下降させながらでもいずれでもよい。

本方法では、プローブ固定担体の温度（その表面近傍の溶液のみの温度）を一定に保つことなく変化させながら電極反応の応答を計測し二本鎖を検出できるの
 5 で、温度が変化して至適温度となるタイミングを正確にとらえて高感度に検出する
 ことができる。また、複数の電極のそれぞれに複数の種類のプローブが固定さ
 れている場合には、プローブ固定担体の温度（その表面近傍の溶液のみの温度）
 10 を変化させながら電極反応の応答を計測することにより、特定の温度となったと
 きにこれを至適温度とする特定二本鎖を検出し、さらに温度を変化させ別の温度
 15 となったときにこれを至適温度とする別の二本鎖を検出する、というように、各
 20 至適温度となるタイミングを正確にとらえてこれらを一斉に高感度に検出するこ
 とができる。

本発明は、前記検出方法であって、前記プローブ固定担体の温度を変化させながら電極反応の応答を連続的に計測することを特徴とする遺伝子の検出方法を提供する。本方法では、温度を変化させながら、各電極それぞれの電極反応の応答を連続的にスキャンすることにより、電流値変化を計測して高感度かつ高速に遺伝子を検出することができる。なお、電極反応の応答の連続的な計測には、所定の時間間隔で周期的に電極反応の応答をサンプリングする場合も含まれる。
 15

本発明は、前記検出方法であって、前記プローブには、当該プローブの塩基配列とフルマッチするDNAと、当該プローブの塩基配列とミスマッチ部分を有するDNAと、がハイブリダイゼーションされてなり、前記プローブ固定担体の温度を変化させながら電極反応の応答を連続的に計測することにより、フルマッチするDNAとミスマッチ部分を有するDNAとの存在割合を検出することを特徴とする遺伝子の検出方法を提供する。フルマッチとは、全ての塩基が相補的であるとの意味である。ミスマッチ部分を有するとは、1塩基のみがミスマッチであるSNPであってもよいし、2塩基以上がミスマッチであるものであってもよい
 20 との意味である。本方法では、温度を変化させながら、各電極それぞれの電極反応の応答を連続的にスキャンすることにより、フルマッチDNAの解離状態およびミスマッチDNAの解離状態が分かり、これにより各存在割合を定量的に検出
 25 することができる。

前記検出方法においては、前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体の温度を連続的に変化させながら電極反応の応答を計測してもよい。又は、前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体の温度をステップ状に変化させながら電極反応の応答を計測してもよい。ステップ状に変化とは、一定時間一定温度を保った後、温度を所定量変化させさらに一定時間その温度を保つという過程を繰り返して温度を上昇又は下降させる意味である。

本発明は、プローブが固定される電極と、当該電極を支持する電極基盤と、当該電極基盤の前記電極を支持する面とは反対の面に接触して配置された均熱部材と、を備えてなり、前記均熱部材は、均熱部材の温度を計測する温度センサーを備えることを特徴とする遺伝子の検出用チップを提供する。

本チップは、例えば、遺伝子の発現量、塩基配列、一塩基置換 SNP、数塩基置換、点突然変異、転座、欠損、增幅、又はトリプレットリピートを検出したり、遺伝子診断に有用である。前記電極は複数のピン電極からなっていてもよい。

15 図面の簡単な説明

図 1 は、第 1 の実施の形態に係る遺伝子検出システムの構造を簡潔に示す一部断面図である。

図 2 は、第 1 の実施の形態に係り、コントローラ、ヒートシンク、ペルチェ素子、及び温度センサーの間系を示すブロック図である。

図 3 は、第 1 の実施の形態に係り、コントローラの処理動作を示すフローチャートである。

図 4 は、第 1 の実施の形態に係り、温度変化と検出電流値変化との関係を示す概念図である。

図 5 は、第 2 の実施の形態に係り、コントローラの処理動作を示すフローチャートである。

図 6 は、第 2 の実施の形態に係る検出例を示す時間と温度との関係を示す図である。

図 7 は、第 1 の実施の形態に係る遺伝子検出システムを備えた遺伝子検出装置

の全体構成を説明する斜視図である。

図8は、検出用チップの構造を示す分解斜視図である。

なお、図中、符号10は遺伝子検出システム、11は電極、12は断熱材、13は容器、14は溶液、15は電極基盤、16は均熱部材、17はペルチェ素子、18はヒートシンク、19は温度センサー、20はコントローラである。

発明を実施するための最良の形態

本発明に係る遺伝子検出システム、これを備えた遺伝子検出装置、検出方法、並びに遺伝子検出用チップの実施の形態を図面を参照しながら以下に説明する。

なお、本発明は以下の実施の形態に限定されるものではない。

(第1の実施の形態に係る遺伝子検出システム)

図1は、本発明に係る遺伝子検出システムの構造を簡潔に示す一部断面図である。図1において、遺伝子検出システム10は、電極を支持する電極基盤15と、電極基盤15に植設された複数のピン形状の電極11と、電極の周面を被覆する断熱材12と、直方体状をなし上部が開放された容器13と、容器内に注入された目的遺伝子を含む溶液14と、加熱冷却手段21と、を備えている。容器13は断熱性の素材からなる。

加熱冷却手段21は、電極基盤の電極を支持する面とは反対の面に接触して配置された均熱部材16と、さらに均熱部材に接触して配置されたペルチェ素子17と、ペルチェ素子の熱を放熱するためにペルチェ素子に接触して配置されたヒートシンク18と、を備えている。均熱部材16は、温度センサー19を備えている。ペルチェ素子17及び温度センサー19には、後述するコントローラが接続されている。

電極11はピンの表面を金でメッキして構成されており、電極基盤15はセラミックスからなる。断熱材12は、PEEKからなる。

各電極11には同一の遺伝子配列を有するプローブが固定されている。プローブとしては、生物試料から抽出した遺伝子を制限酵素で切断し、電気泳動による分離などで精製した遺伝子、PCR法等の手法を用い増幅して得られた遺伝子、

あるいは化学合成したDNAのいずれもが用いられる。プローブの配列は予め決定しておくことが好ましい。プローブの配列は周知の手法を用いて決定される。

5 プローブを電極に固定化する方法としては、公知の方法が用いられる。例えば、電極が金である場合、プローブ本体にチオール基（SH基）を導入し、金と硫黄との金一硫黄結合を介してプローブが電極に結合される。プローブ本体にチオール基を導入する方法としては、Mizuo MAEDA, Koji NAKANO, Shinji UCHIDA, and Makoto TAKAGI, Chemistry Letters, 1805-1808 (1994) あるいは B. A. Connolly, Nucleic Acids Rs., 13, 4484 (1985) に記載されている。上記の方法で得られるチオール基を有するプローブを金電極に滴下し、低温下（例えば4°C）で、数時間放置することにより、プローブが金電極に固定化される。

10 なお、他の方法として、グラシーカーボンを過マンガン酸カリウムで酸化することにより電極表面にカルボン酸を導入し、プローブに修飾されたアミノ基とアミド結合を形成させて固定化し得る。グラシーカーボンへの固定化は、Kelly M. Millan and Susan R. Mikkelsen, Analytical Chemistry 65, 2317-2323 (1993) に記載されている。また、電極の表面に金メッキをする前の前処理方法やSH-金結合に関しては、例えば J. Am. Chem. Soc 111号 P321~ 1989年 C. D. Bain 著や、Anal. Chem. 70号 P2396~1998年 JJ. Gooding 著に記載がある。

15 (第1の実施の形態に係る遺伝子検出システムを用いた検出方法)
図1に示した遺伝子検出システムを用いた検出方法について、図2及び図3に基づき説明する。

20 図2はコントローラ20と、ペルチェ素子17及び温度センサー19との関係を示すブロック図であり、図3は図2のコントローラ20の処理動作を示すフローチャートである。

25 図2に示すように、コントローラ20は、出力側端子31と、入力側端子32と、当該出力側端子31及び入力側端子32に接続されたマイクロコンピュータシステム等によって構成される温度制御部33と、当該温度制御部33に接続された目標温度入力手段34と、を備えている。温度センサー19は、入力側端子32に接続されている。ペルチェ素子17は、出力側端子31に接続されている。

目標温度入力手段 3 4 に目標温度を入力すると、温度制御部 3 3 に目標温度 T_x が設定されるようになっている。温度制御部 3 3 は、目標温度 (T_x) と入力側端子 3 2 から入力された計測温度 (T) とを比較し、その結果に応じてペルチェ素子 1 7 の電流をオンオフしたり、電流の方向を切り換えるべく、処理信号を出力側端子 3 1 へ送る。

5 以下に、図 3 のフローチャートを参照して具体的に説明する。

まず、目標温度入力手段 3 4 に目標温度 (T_x) 及びハイブリダイゼーションさせる時間 (Δt) を入力して、温度制御部 3 3 のメモリに目標温度 T_x 及び時間 Δt を設定する。そして、検出処理を開始させると (S 1) 、温度制御部 3 3 は、温度センサー 3 2 の計測温度 (T) を読み込み、計測温度 T が目標温度 T_x と等しいか否かを判断する (S 2) 。計測温度 T と目標温度 T_x とが等しくない場合には、温度制御部 3 3 は計測温度 T が目標温度 T_x より小さいか否かを判断する (S 4) 。

10 計測温度 T が目標温度 T_x より小さい場合 ($T < T_x$) には、ペルチェ素子 1 7 の配線 A を通電し (S 5) 、正の熱流束をペルチェ素子 1 7 から均熱部材 1 6 を介して電極基盤 1 5 及び電極 1 1 へ伝達させ、電極表面近傍の溶液を加熱する。計測温度 T が目標温度 T_x と等しい場合 ($T = T_x$) には、ペルチェ素子 1 7 をオフにする (S 3) 。

15 計測温度 T が目標温度 T_x より大きい場合 ($T > T_x$) には、ペルチェ素子 1 7 の配線 B を通電し (S 6) 、負の熱流束をペルチェ素子 1 7 から均熱部材 1 6 を介して電極基盤 1 5 及び電極 1 1 へ伝達させ、電極表面近傍の溶液を冷却する。

このように、温度制御部 3 3 は温度センサー 1 9 の計測温度に基づいてペルチエ素子 1 7 をフィードバック制御して、計測温度 T を目標温度 T_x に維持する。

20 このとき、均熱部材 1 6 があるので、電極基盤 1 5 の温度が均一に保たれ、各電極 1 1 の表面へも同じ熱量の熱流束が伝達されることになる。電極基盤 1 5 および電極 1 1 は熱伝導率が高い素材から構成されているので、温度センサー 1 9 により計測される均熱部材 1 6 の温度と、電極表面の温度とは実質的に同一となる。加熱又は冷却は、温度センサー 1 9 の計測温度が連続的に変化するように調

節しながら行なう。

計測温度 T が目標温度 T_x になった状態においては、溶液中に浸漬された電極の先端部近傍の溶液の部分のみが目標温度 T_x となっている。この $T = T_x$ の条件下で、プローブと相補的な配列を有する目的遺伝子がハイブリダイゼーションされ、二本鎖が形成される。温度制御部の処理動作を、計測温度 T が目標温度 T_x になったときにタイマーを起動させ、 Δt が経過した際にハイブリダイゼーションの終了をアラームで知らせる等の構成としてもよい。ハイブリダイゼーションが終了した後、各種の電気的シグナルを検出して目的遺伝子の配列の検出を行なう。

上記のようにして、ハイブリダイゼーションさせてるので、目標温度 T_x にまで加熱又は冷却するかあるいは目標温度 T_x に維持する溶液の容積が微量で足り、高感度かつ高速に検出を行なうことができる。

なお、目的遺伝子を含む溶液の調製方法およびハイブリダイゼーションの方法は周知の方法を用いる。

本実施の形態においては、コントローラによりペルチェ素子を駆動制御する場合について説明したが、ペルチェ素子及びヒートシンクの双方をコントローラにより駆動制御するように構成してもよい。

(第 1 の実施の形態に係る遺伝子検出システムを用いた他の検出方法)

図 1 に示した遺伝子検出システムを用いた他の検出方法について、図 4 に基づいて説明する。図 4 は本検出例を示す温度に対する検出電流値の関係を示す概念図である。

図 4 に示すように、プローブ固定担体の温度を上昇させながら、連続的に検出電流値を計測する。図 4 (a) に示すように、プローブにフルマッチDNAのみがハイブリダイゼーションされた場合、温度センサーの計測温度 T_A において検出電流値が大きく変化する。図 4 (b) に示すようにフルマッチDNAとミスマッチDNAとの双方がハイブリダイゼーションされた場合、フルマッチDNAに起因する電流値変化以外に、ミスマッチDNAに起因する電流値変化が計測温度 T_B において生ずる。計測温度 T_A における電流値変化および計測温度 T_B にお

ける電流値変化を計測することにより、プローブにハイブリダイゼーションされたDNAにおける、フルマッチDNAおよびミスマッチDNAの存在割合（存在量の比）を各電極それぞれについて算出することができる。

（第2の実施の形態に係る遺伝子検出システム及びこれを用いた検出）

5 本実施の形態では、各電極にはそれぞれ異なる遺伝子配列を有するプローブが固定されている点が上記第1の実施の形態に係る遺伝子検出システムとは異なっている。本実施の形態においても、ペルチェ素子、温度センサー及びコントローラは図2に示すような関係にある。

10 以下に、本実施の形態に係る遺伝子検出システムを用いた検出処理を図5及び図6に基づき説明する。図5はコントローラの処理動作を示すフローチャートである。図6は本実施の形態に係る検出例を示す時間と温度との関係を示す図である。

15 まず、各目標温度(T_i)よりも低温にて、目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせ、二本鎖を形成させる。この二本鎖を含む溶液を容器13に注入する。

次に、図5に示すように、目標温度入力手段34に目標温度 T_i を入力して温度制御部33の図示しないメモリに目標温度 T_i を設定する(S7)。本実施の形態においては各電極には異なるプローブが固定されているので、各プローブに至適な目標温度をそれぞれ入力する。入力されたデータは、目標温度が低い順に至適な目標温度を($i = 1, i = 2 \dots i = m_{ax}$ の順に)ソートされテーブル管理されるよう構成してもよい。

20 そして、コントローラ20の図示しない入力手段から検出処理の開始を指示すると、加熱と温度センサーによる計測とが開始され、 $i = 1$ について検出処理が開始される(S8)。加熱は、例えばペルチェ素子17を駆動させて、本処理動作が終了するまで継続して行なわれるようになっている。

25 $i = 1$ について検出処理が開始されると、温度制御部33はメモリから目標温度 T_1 を読み出す(S9)。そして、温度センサーによる計測温度 T が目標温度 T_1 となったタイミングで(S10)、電極反応の応答を計測する(S11)。

計測温度が上昇するにしたがって、一旦ハブリダイゼーションされた二本鎖のうち、相同性の低いものは解離し、目標温度 T_1 になった時には T_1 を至適温度とする二本鎖形成状態のみが残るので、そのタイミングで電極反応の応答を計測する。

5 その後、 $1 = \text{max}$ であるか否かを判断し (S 1 2) 、 max でない場合には、
温度制御部 3 3 はメモリから T_2 を読み出す (S 1 3)。このように、 i が max
 x でない場合 (S 1 2) 、次に $i + 1$ について検出処理を行なう (S 1 3)。 i
が max である場合 (S 1 2) には検出処理を終了する (S 1 4)。

図5に示すように、本実施の形態では、一定の割合でプローブ固定担体の温度を上昇させながら、温度センサーの計測温度Tが目標温度T1となったタイミング(t1)で電極反応の応答を計測し、次に目標温度T2となったタイミング(t2)で電極反応の応答を計測し、次に目標温度T3となったタイミング(t3)で電極反応の応答を計測する。このようにして計測された温度と電極反応の応答との関係から二本鎖を検出することができる。

15 このように、各電極の温度を一律に変化させながら、温度が各至適温度となる各タイミングをとらえて電極反応の応答を計測することとすれば、自動的に、高感度に、かつ高速に遺伝子を検出することができる。また、本実施の形態のように複数の種類のプローブを固定した場合においては、各至適温度 (T_x) となるタイミングをとらえて一斉に検出することができるメリットもある。

なお、本実施の形態においては、複数の電極のそれぞれすべてに異なるプローブが固定されている場合について説明したが、本発明は、少なくとも二種以上のプローブが固定されている場合や、電極が一つである場合、全ての電極に一種類のプローブが固定されている場合、等にも適用される。

(第3の実施の形態に係る遺伝子検出システム)

25 本実施の形態では、電極基盤、均熱部材、温度センサー、ヒートシンクおよびペルチェ素子をそれぞれ各電極と同数備え、複数の各均熱部材の温度をそれぞれ計測しながら、各ペルチェ素子を駆動させて、各電極基盤の温度をそれぞれ独立に制御できるようにし、かつ、各電極にはそれぞれ異なる遺伝子配列を有する

ロープが固定されている点が上記第1の実施の形態に係る遺伝子検出システムとは異なっている。

また、本実施の形態では、コントローラは、複数の各ペルチェ素子、各温度センサーにそれぞれ接続される複数の出力側端子及び入力側端子を備えている。コントローラの目標温度入力手段からは、複数のプローブそれぞれに固有な T_x を設定できるようになっている。

本実施の形態では、溶液中の電極表面近傍において熱流束が対流する範囲（温度境界層）が互いに重ならない程度に、各電極を離して配置する必要がある。

本実施の形態では、コントローラにより各電極基盤の温度をそれぞれ独立に制御することができるので、一回の検出でそれぞれ異なる目標温度 T_x を持つプローブのハイブリッド状態を一斉に検出することができ、検出を高感度かつ迅速に行なうことができるという利点がある。

なお、本実施の形態は、複数の電極のそれぞれすべてに異なるプローブが固定されている場合のみならず、少なくとも二種以上のプローブが固定されている場合に適用されるものである。例えば、二種以上のプローブが固定されている場合であって、同種プローブごとに共通の電極基盤、均熱部材、温度センサー、ヒートシンクおよびペルチェ素子を備えていてもよい。

(第1の実施の形態に係る遺伝子検出システムを備えた遺伝子検出装置)

図7は、本発明の遺伝子検出装置の全体構成を説明する斜視図である。

図7において、本発明に係る遺伝子検出装置100は、検出用チップ104と、この検出用チップ104を差し込み可能な装入口103を有する測定装置102と、パソコン101とから構成される。

図8は、検出用チップ112の構造を示す図であり、図8に示すように、検出用チップ112は、中央部に窪み118が形成された容器114と、容器114に着脱可能に装着される本体部115とから構成される。本体部115は、電極基盤121と、電極基盤121に支持され容器114の窪み118に対応する領域に均等に突設された多数のピン状の電極110と、電極基盤121の電極110を支持する面とは反対の面に接触して配置された均熱部材122と、均熱部材

122の温度を計測する温度センサー（図示は省略する）と、を有している。

パソコン101の装入口103の上部には、ペルチェ素子123と、さらにその上に接触して配置されたヒートシンクとが備えられている。また、パソコン101の内部には、コントローラ（図示は省略する）が備えられている。

5 窪み118内に、目的遺伝子を含む溶液を注入した後、容器114に本体部115を装着し、検出用チップ112を上記装入口103へ差し込むことにより、検出用チップ112側の均熱部材122と測定装置102側のペルチェ素子123とが接触する。そして遺伝子検出装置100の中においては、図1に示したような配置関係が構成される。

10 コントローラの目標温度入力手段であるパソコン101のキーボードから目標温度 T_x を入力する。そして、図2のコントローラ及び図1の遺伝子検出システムを用いた検出方法と同様にして、温度を変化させ T_x となったところでハイブリダイゼーションさせる。その後、ハイブリダイゼーションにより形成された二本鎖にインターラーベル化され、電極用ターミナル端子27及び各電極用ターミナル端子20を、測定装置102の受け端子（図示は省略する）に接続し、選択スイッチを介して電圧回路に接続し、共通電極と各電極110との間に弱い電圧をかけると、インターラーベル化された部位と、電極110との間には、電圧回路及び共通電極を通して微弱電流が流れる。この電流を検出することにより遺伝子の検出を行う。

20 本実施の形態の遺伝子検出装置を用いることとすれば、温度コントロールする溶液の容積が微量で足りるため、高感度かつ高速に検出を行なうことができる。

なお、本実施の形態においては、検出用チップの均熱部材が温度センサーを備える場合について説明したが、パソコンの内部に均熱部材と接続しその温度を計測する温度センサーを備えた構成としてもよい。

25 また、上記第2の実施の形態に係る遺伝子検出システムを備えた遺伝子検出装置についても、本実施の形態と同様に構成することができる。

また、上記実施の形態においては、温度を連続的に上昇させながら調節する場合について説明したが、温度を連続的に下降させたり、ステップ状に上昇しないし

下降させるようにしてもよい。

また、上記実施の形態において、ピン形状の複数の電極を電極基盤にアレイ状に植設した場合について説明したが、これに限定されない。

また、上記実施の形態においては、プローブを電極に固定し電気的シグナルを検出する場合について説明したが、プローブを電極ではないプローブ固定担体に固定し、蛍光シグナルを検出する等してもよい。

産業上の利用可能性

本発明に係る遺伝子検出システム、これを備えた遺伝子検出装置、検出方法、並びに遺伝子検出用チップは、プローブ固定担体ないし電極の表面付近の溶液のみを温度コントロールするので、高感度かつ高速大量（ハイスループット）に遺伝子を検出することができる。

特に、本発明では至適温度 T_x を正確に設定することができるので、S N Pを正確に検出することができる。

本発明に係る遺伝子検出システム、遺伝子検出装置、検出方法、並びに遺伝子検出用チップは、生物学、医学分野での遺伝子変異解析や遺伝子発現解析に有効な手段であり、遺伝子診断、予防医学、遺伝子治療、創薬に利用できる。

請求の範囲

1. 遺伝子検出システムであって、

目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせて検出するものであり、

5 プローブが固定されるプローブ固定担体と、

前記プローブ固定担体のプローブを固定する面とは異なる他の箇所に接触して配置された加熱冷却手段と、を備えた遺伝子検出システム。

10 2. 前記加熱冷却手段が、前記プローブ固定担体のプローブを固定する面とは反対の面に接触して配置された均熱部材と、さらに均熱部材に接触して配置された加熱冷却素子と、を備えてなる請求項1記載の遺伝子検出システム。

15 3. 前記均熱部材の熱容量が、前記プローブ固定担体の熱容量より大きい請求項2記載の遺伝子検出システム。

4. 前記均熱部材は、当該均熱部材の温度を計測する温度センサーを備えており、当該温度センサーにより計測した温度に基づいて前記加熱冷却素子の駆動を制御する請求項2記載の遺伝子検出システム。

20 5. 前記加熱冷却素子がペルチェ素子又はヒーターである請求項2記載の遺伝子検出システム。

6. 前記プローブ固定担体の一部又は全部が目的遺伝子を含む溶液に浸漬した状態において、前記加熱冷却手段と目的遺伝子を含む溶液との間で、プローブ固定担体を介して熱流束が伝達するように構成した請求項1記載の遺伝子検出システム。

7. 前記プローブ固定担体は、プローブが固定される電極と、当該電極を支持す

る電極基盤と、からなる請求項 1 記載の遺伝子検出システム。

8. 前記電極は、周面が断熱材で被覆されてなり、

前記加熱冷却手段からの熱流束が電極基盤を介して電極端面から目的遺伝子を

5 含む溶液に流れるように構成した請求項 7 記載の遺伝子検出システム。

9. 前記電極が少なくともその表面に金、銀又は銅からなる部分を備え、前記電

極基盤がセラミックスからなる請求項 7 記載の遺伝子検出システム。

10 10. 前記電極は複数の電極からなる請求項 7 記載の遺伝子検出システム。

11. 前記電極は複数の電極からなり、それぞれに複数の種類のプローブが固定
されてもよく、

前記電極基盤は当該複数の電極をそれぞれ支持する複数の電極基盤からなり、

15 前記加熱冷却手段は、前記複数の電極基盤の温度をそれぞれ独立して制御する
請求項 7 記載の遺伝子検出システム。

12. 請求項 1 記載の遺伝子検出システムと、前記加熱冷却手段を駆動制御する
制御手段と、を備えた遺伝子の検出装置。

20

13. 遺伝子の検出方法であって、

請求項 7 記載の遺伝子検出システムを用いた遺伝子の検出方法であって、

前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体を所望の温度に調節し、
目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせて形成された二本鎖を電気
25 化学的に検出する遺伝子の検出方法。

14. 遺伝子の検出方法であって、

請求項 7 記載の遺伝子検出システムを用いた遺伝子の検出方法であって、

目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせて二本鎖を形成させる過程と、

前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体の温度を変化させながら電極反応の応答を計測し、当該温度と電極反応の応答との関係から、前記二本鎖を検出する過程と、を有する遺伝子の検出方法。
5

15. 前記プローブ固定担体の温度を変化させながら電極反応の応答を連続的に計測する請求項14記載の遺伝子の検出方法。

10 16. 前記プローブには、当該プローブの塩基配列とフルマッチするDNAと、当該プローブの塩基配列とミスマッチ部分を有するDNAと、がハイブリダイゼーションされてなり、

前記プローブ固定担体の温度を変化させながら電極反応の応答を連続的に計測することにより、フルマッチするDNAとミスマッチ部分を有するDNAとの存在割合を検出する請求項14記載の遺伝子の検出方法。
15

17. 前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体の温度を連続的に変化させながら電極反応の応答を計測する請求項14記載の遺伝子の検出方法。

20 18. 前記加熱冷却手段を駆動させて前記プローブ固定担体の温度をステップ状に変化させながら電極反応の応答を計測する請求項14記載の遺伝子の検出方法。

19. 遺伝子の検出用チップであって、

プローブが固定される電極と、当該電極を支持する電極基盤と、当該電極基盤の前記電極を支持する面とは反対の面に接触して配置された均熱部材と、を備えてなり、
25

前記均熱部材は、当該均熱部材の温度を計測する温度センサーを備える遺伝子の検出用チップ。

要約書

目的遺伝子をプローブとハイブリダイゼーションさせて検出する遺伝子検出システムであって、プローブが固定されるプローブ固定担体と、前記プローブ固定担体のプローブを固定する面とは異なる他の箇所に接触して配置された加熱冷却手段と、を備えることにより、ハイブリダイゼーションによる遺伝子検出を、高感度かつ高速に行なうことができるようとする。